

Original research

Callus formation from full leaf and leaf parts of *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb) KoehneMuhammet DOĞAN¹

Department of Biology, Kamil Ozdag Faculty of Science, Karamanoglu Mehmetbey University, Yunus Emre Campus, 70200 Karaman, Turkey.
e-mail: mtdogan1@gmail.com

Abstract: *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb.) Koehne is a medicinal aquatic plant belonging to the family Lythraceae. Due to its ability to accumulate heavy metals, it also has a potential to be used for wastewater treatment. In this study, the effects of the combinations of 0.05-0.25 mg/L Gibberellic acid (GA₃) and 0.25 mg/L Thidiazuron (TDZ) on *in vitro* callus formation from the full leaf, upper half of leaf and lower half of leaf explants of *R. rotundifolia* were investigated. The highest percentage of callus formation (100%) from the full leaf, upper leaf and lower leaf explants were obtained on MS medium containing 0,25 mg/L GA₃ and 0,25 mg/L TDZ, 0,05 and 0,25 mg/L GA₃ + 0,25 mg/L TDZ and 0,05 mg/L GA₃ + 0,25 mg/L TDZ. More callus concentrations were recorded in culture media containing GA₃ at low concentrations. The shortest callus formation time was determined on the lower leaf explant cultured on MS medium containing 0.05 and 0.25 mg/L GA₃ + 0.25 mg/L TDZ and on the 10th day. Various secondary metabolites from callus of *R. rotundifolia* using plant tissue culture techniques can be obtained and these metabolites can be used in the pharmaceutical field. In addition, callus formations can help gene transfer studies.

Keywords: Gibberellic acid, Thidiazuron, *In vitro*, Callus, *Rotala rotundifolia*, Leaf explant

Citing: Doğan, M. 2019. Callus formation from full leaf and leaf parts of *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb) Koehne. *Acta Biologica Turcica*, 32(2): 78-83.

Rotala rotundifolia (Buch-Ham. ex Roxb) Koehne'nin tam yaprak ve yaprak parçalarından *in vitro* kallus oluşumu

Özet: *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb.) Koehne Lythraceae familyasına ait tıbbi sucül bir bitkidir. Ayrıca, ağır metalleri bünyesinde akümüle etme özelliği nedeniyle de atık suların arıtımında kullanılabilecek bir potansiyele sahiptir (fitoremediasyon). Bu çalışmada, *R. rotundifolia*'nın tam yaprak, yaprak üst yarısı ve yaprak alt yarısı eksplantlarından *in vitro* kallus oluşumu üzerine 0,05-1,25 mg/L Giberellik asit (GA₃) ve 0,25 mg/L Thidiazuron (TDZ) kombinasyonunun etkisini araştırılmıştır. Tam yaprak, üst yaprak ve alt yaprak eksplantlarından kallus oluşturma oranı (%100) sırasıyla 0,25 mg/L GA₃ ve 0,25 mg/L TDZ içeren MS ortamında, 0,05 ve 0,25 mg/L GA₃ + 0,25 mg/L TDZ içeren MS ortamında ve 0,05 mg/L GA₃ + 0,25 mg/L TDZ içeren MS ortamında elde edilmiştir. GA₃'yı düşük konsantrasyonlarda içeren kültür ortamlarında daha fazla kallus yoğunluğu kaydedilmiştir. En kısa kallus oluşturma süresi 0,25 mg/L GA₃ + 0,25 mg/L TDZ içeren MS ortamında yaprak eksplantlarında ve 10. günde belirlenmiştir. Bitki doku kültürü teknikleri kullanılarak *R. rotundifolia*'nın kalluslarından çeşitli sekonder metabolitler elde edilebilir ve bu metabolitler farmasötik alanda kullanılabilir. Ayrıca kallus oluşumları gen aktarım çalışmalarına yardımcı olabilir.

Anahtar kelimeler: Giberellik asit, Thidiazuron, *In vitro*, Kallus, *R. rotundifolia*, Yaprak eksplantı

Giriş

Lythraceae familyasından olan *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb.) Koehne akuatik ve amfibik bir

bitkidir. Güney ve Güneydoğu Asya, Japonya, Afrika, Avustralya, Çin, Hindistan ve Kuzey Amerika'da dağılım göstermektedir (Tan ve ark., 2009; Bhowmik ve ark.,

2012). *R. rotundifolia* bitkisi Çin'in Yunnan eyaletinde kan çıbanı, romatizma ve eklem ağrısı tedavilerinde kullanılmaktadır. Ayrıca *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus diphtheriae* bakterilerine karşı anti-mikrobiyal özelliğe sahiptir (Tan ve ark., 2009). 31 sulak alan tıbbi bitkisinin anti oksidant ve toplam fenolik içeriğinin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada *R. rotundifolia*'nın sulu ekstraktlarının en yüksek antioksidant kapasiteye sahip olduğu ve fenolik bileşikler bakımından da ikinci sırada yer aldığı bildirilmiştir (Ho ve ark., 2012). *R. rotundifolia* arsenik (As) ve Demir (Fe) gibi bazı ağır matalleri absorbe etme özelliğine de sahiptir (Li ve ark., 2011). Bu özelliği nedeniyle de atık suların ağır metallerden arındırılmasında (remediasyon) kullanıma potansiyeline sahiptir. Bunların yanı sıra, *R. rotundifolia*'nın akvaryumlarda süs bitkisi olarak kullanılması (Anonim, 2014) da bu bitkinin ekonomik açıdan önemini artırmaktadır.

Aseptik koşullarda bitkinin doku, hücre veya organlarının çeşitli besin ortamlarında kültüre alınması, onlardan yeni hücreler, dokular, organlar, yeni bitkiler veya bitkisel ürünlerin üretilmesi işlemlerine bitki doku kültürü denilmektedir (Babaoğlu ve ark., 2001). Bitki doku kültürü çalışmalarında kallus kültürleri çoklu sürgün rejenerasyonu (Tang ve ark., 2006; Cheruvathur ve ark., 2012; Gentile ve Uccella, 2014) ve gen aktarımı (Hoenemann ve ark., 2012; Turana ve ark., 2014) gibi çalışmalarda kullanılmaktadır. Bu hormon kombinasyonları neden seçildi bu bölümde kısa bir ekleme yapılabilir.

Bu çalışmada, giberellik asit (GA_3) ve *thidiazuron* (*TDZ*) hormon kombinasyonlarının, *R. rotundifolia* bitkisinin tam yaprak, yaprak üst yarısı ve yaprak alt yarısı eksplantlarından kallus oluşturması üzerine etkisi araştırılmıştır. Yaptığımız araştırmalar çerçevesinde *R. rotundifolia*'nın tam yaprak, yaprak üst yarısı ve yaprak alt yarısı kullanılarak *in vitro* kallus oluşumu üzerine bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada kullanılan bitki materyali Konya ilinde bulunan akvaryumculardan temin edilmiştir. *R. rotundifolia*'nın yüzey sterilizasyonuna başlamadan önce 10 dk akan çeşme suyunda bekletilmiştir. Bitkilerin yüzey sterilizasyonu %20 oranında hidrojen peroksit

(H_2O_2) ile 10 dk muamele sonunda elde edilmiştir. Yüzey sterilizasyonundan sonra eksplantlar steril saf su ile 3 kez 5'er dakika durulama işlemine tabi tutulmuştur. Steril edilen sürgün ucu ve boğum eksplantları MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamı (Tablo 1) içeren steril magentalarda $24^{\circ}C$ 'de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta kültüre alınmıştır. Denemelerde bu kültür ortamında gelişen 4 haftalık bitkilerden alınan yaprak, yaprak üst yarısı ve yaprak alt yarısı parçaları TDZ (0,25 mg/L) ve GA_3 (0,05, 0,25, 0,50, 0,75, 1,00 ve 1,25 mg/L) kombinasyonlarını içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır (Tablo 2).

Tüm kültür ortamlarında MS mineral tuz ve vitaminleri, %3 sükröz ve %0,65'lik agar ile katılaştırılan temel besin ortamı kullanılmıştır. Ortam hazırlığında distile saf su kullanılmıştır. Besin ortamının pH'sı, 1N NaOH ve 1N HCl kullanılarak 5,7'e ayarlandıktan sonra 1,2 atmosfer basıncı altında ve $120^{\circ}C$ 'de 20 dk tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Denemelerde eksplantlar beyaz LED (Light-Emitting Diode) ışık (1500 lüks) altında $24^{\circ}C$ sıcaklıkta ve 16 saat ışık 8 saat karanlık fotoperiyodunda bekletilmiştir.

Tablo 1. Murashige ve Skoog (1962) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları

	Ortamda Bulunan Maddeler	Konsantrasyonu (mg/L)
Makro Elementler	NH_4NO_3	1650,000
	KNO_3	1900,000
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440,000
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370,000
	KH_2PO_4	170,000
	KI	0,830
Mikro Elementler	H_3BO_3	6,200
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22,300
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,600
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,250
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,850
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37,250
Myo-Inositol	100,000	
Vitaminler	Nicotinic Acid	0,500
	Pyrotinic Acid	0,500
	Thiamine-HCl	0,100
	Glycine	2,000

Tablo 2. 0,25 mg/L TDZ ve farklı GA₃ dozlarının *Rotala rotundifolia*'nın yaprak, yaprak üst yarısı ve yaprak alt yarısı eksplantlarından kallus oluşumuna ait varyans analizi

VK	SD	Tam Yapraktan Kallus Yüzdesi (%)		Yaprak Üst Yarısından Kallus Yüzdesi (%)		Yaprak Alt Yarısından Kallus Yüzdesi (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ortam	5	1608,23	7,44**	1287,15	3,63*	728,46	1,52 ^{ös}
Hata	12	216,04	-	354,99	-	478,47	-
Σ	17	-	-	-	-	-	-

VK: Varyasyon Kaynakları; SD: Serbestlik Derecesi, **0.01 düzeyinde önemli, *0.05 düzeyinde önemli, ^{ös} Önemsiz

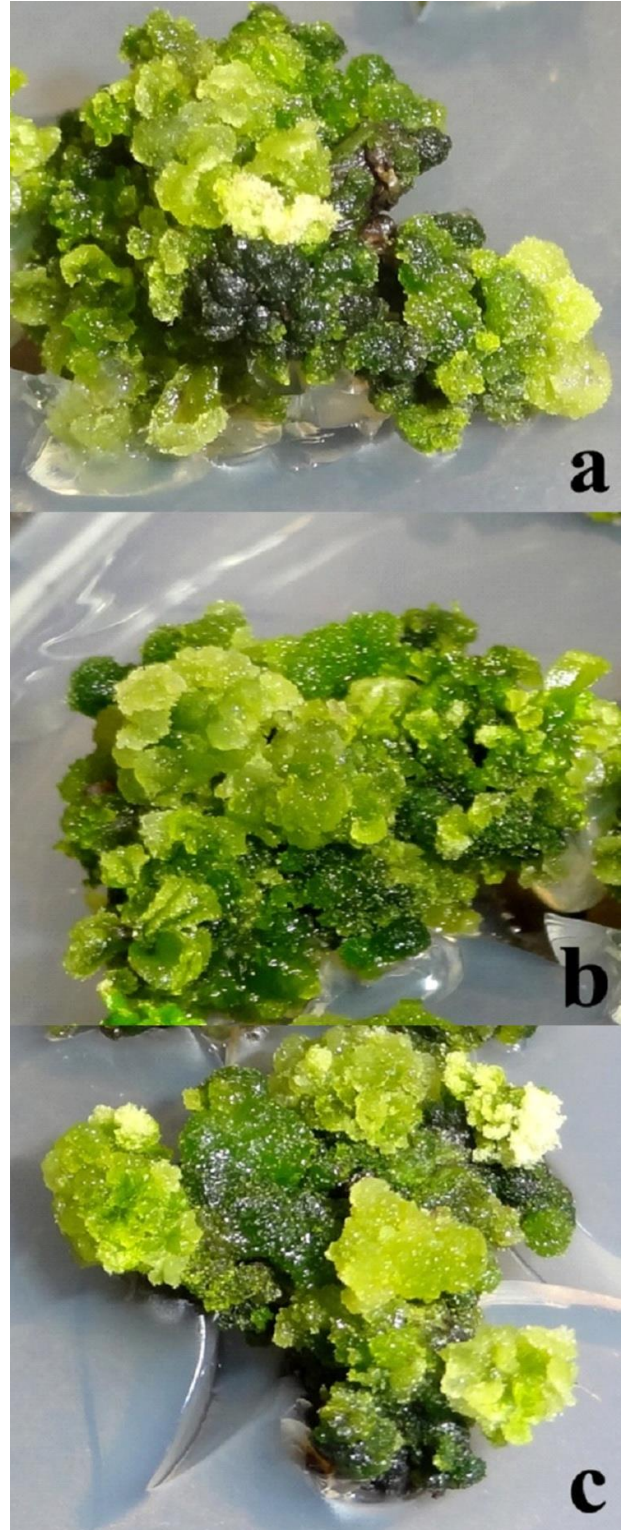
Denemeler 6 eksplant ve 3 tekerrürlü olarak 100x10 mm'lik petri kaplarında yürütülmüştür. Çalışmadan elde edilen veriler, bilgisayarda SPSS 16 for Windows programı ile tesadüf parselleri deneme desenine göre analiz edilmiştir. Post Hoc testleri için Duncan testleri uygulanmıştır. Yüzde değerleri istatistik analizi yapılmadan önce arcsin transformasyon'una tabi tutulmuştur (Snedecor ve Cochran, 1967).

Bulgular ve Tartışma

Rotala rotundifolia'nın tam yaprak, yaprak üst yarısı ve yaprak alt yarısı eksplantları *in vitro* kallus oluşumu için GA₃ (0,05-1,25 mg/L) ve TDZ (0,25 mg/L) dozlarını içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır (Tablo 2). En erken kallus oluşturma zamanları 0,05 mg/L ve 0,25 mg/L GA₃ + 0,25 mg/L TDZ içeren MS ortamında sırasıyla yaprak alt yarısı eksplantında 10. günde, tam yaprak eksplantında 11. günde ve yaprak üst yarısı eksplantında 14. günde kaydedilmiştir. Benzer şekilde Kumer Sen ve ark (2014) 1,0-5,0 mg/L 2,4-D ve 0,5 mg/L BAP içeren MS ortamında *Achyranthes aspera* L. bitkisinin yaprak eksplantı ile yaptıkları çalışmada en erken kallus oluşumunu 9. günde kaydetmişlerdir.

Sekiz hafta sonunda deneme sonlandırılmış ve veriler alınarak analiz edilmiştir. Yüksek GA₃ içeren bazı kültür ortamlarındaki eksplantlarda oldukça az sayıda ve kısa sürgün oluşumları da gözlenmiştir. Tüm eksplantlarda kallus oluşturma yoğunluğu genellikle GA₃'ün düşük olduğu konsantrasyonlarda fazla olarak kaydedilmiştir (Şekil 1). Ayrıca, yaprak alt yarısı eksplantında genellikle diğer eksplantlara göre daha fazla kallus oluşturma yoğunluğu gözlenmiştir. Buna karşın, *Ceratophyllum demersum* L. (Dogan ve ark., 2015; Karatas ve ark., 2015), *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze (Dogan ve ark., 2016) ve *Pistia stratiotes* L.

(Aasim ve ark., 2017) gibi su bitkileri ile yürütülen çalışmalarda herhangi bir kallus oluşumu bildirilmemiştir.



Şekil 1. 0,25 mg/L GA₃ + 0,25 mg/L TDZ içeren MS ortamında (a) yaprak, (b) yaprak üst yarısı ve (c) yaprak alt yarısı eksplantlarından kallus oluşumları

Yapılan varyans analizi sonuçlarına göre (Tablo 2) yaprak alt yarısı eksplantlarının kallus yüzdeleri ile ortamlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Buna karşın tam yaprak eksplantının kallus yüzdesi ile ortamlar arasında $p < 0,01$ düzeyinde ve yaprak üst yarısı eksplantının kallus yüzdesi ise $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkileşim göstermiştir. Bu etkileşimin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Tablo 3’de verilmiştir.

0,05-1,25 mg/L GA₃ ve 0,25 mg/L TDZ içeren MS besin ortamlarında kallus oluşumu yüzdeleri tam yaprak eksplantlarında %44,44-100,00 arasında, yaprak üst yarısında %50,00-100,00 arasında ve yaprak alt yarısında

%61,11-100,00 arasında belirlenmiştir (Tablo 3). Benzer şekilde Karatas ve ark (2013) önemli bir su bitkisi olan *Hygrophila polysperma* yaprak eksplantlarını 0,10-1,60 mg/L TDZ içeren MS ortamında kültüre almış ve kallus oluşum frekansını %50,00-93,75 arasında kaydetmişlerdir. Ahmad ve ark (2010) *Ruta graveolens* L. bitkisinin yaprak eksplantı ile yaptığı çalışmada kallus oluşturma oranını BAP (1.0-10.0 µM) içeren MS ortamında %44.6 ± 2.40 -70.0 ± 2.64 arasında, Kinetin (1.0-10.0 µM) içeren MS ortamında %29.0 ± 2.08 - 69.0 ± 3.78 arasında ve BAP(7.5 µM) + NAA (0.5-5.0 µM) içeren MS ortamında ise %60.6 ± 2.96 - 92.3 ± 2.18 arasında kaydetmişlerdir.

Tablo 3. 0,25 mg/L TDZ ve farklı GA₃ kombinasyonunu içeren MS besin ortamında *R. rotundifolia*’nın yaprak, yaprak üst yarısı ve yaprak üst yarısı eksplantlarından kallus oluşumuna etkisi

Büyüme Düzenleyici (mg/L)		Tam Yaprak			Yaprak Üst Yarısı			Yaprak Alt Yarısı		
GA ₃	TDZ	Kallus Yüzdesi (%)**	Kallus Yoğunluğu	Kallus Oluşma Zamanı (gün)	Kallus Yüzdesi (%)*	Kallus Yoğunluğu	Kallus Oluşma Zamanı (gün)	Kallus Yüzdesi (%) ^{ös}	Kallus Yoğunluğu	Kallus Oluşma Zamanı (gün)
0,05	0,25	94,44 ^a	+++	11	100,00 ^a	+++	14	100,00	+++	10
0,25	0,25	100,00 ^a	+++	11	100,00 ^a	+++	14	94,44	+++	10
0,50	0,25	83,33 ^{ab}	+++	13	88,89 ^{ab}	++	15	88,89	+++	11
0,75	0,25	66,66 ^{ab}	++	14	83,33 ^{abc}	++	15	77,77	+++	13
1,00	0,25	44,44 ^b	++	16	61,11 ^c	+	17	66,66	++	15
1,25	0,25	50,00 ^b	+	16	50,00 ^c	+	18	61,11	+	15

Fazla kallus: +++, Normal kallus: ++, Az kallus: + Kallus yok: -, **Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark 0,01 düzeyinde önemlidir, *Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark 0,05 düzeyinde önemlidir, ^{ös} Önemsiz

Tam yaprak eksplantında en yüksek kallus oluşum oranı (%100) 0,25 mg/L GA₃ + 0,25 mg/L TDZ içeren MS ortamında kaydedilirken, en düşük kallus oranı (%44,44) ise 1,00 mg/L GA₃ + 0,25 mg/L TDZ içeren MS ortamında kaydedilmiştir. En yüksek kallus oluşumu GA₃’ün düşük oranlarda kullanıldığı ortamlarda elde edilmiştir. Buna karşın, Te-chato ve Lim (2000) kallus oluşumu için *Garcinia mangostana* Linn. bitkisinin yaprak eksplantını BAP (0.44-4.44 µM) ve TDZ (0.45-4.50 µM) içeren MS ortamında kültüre almış ve en yüksek kallus oluşum yüzdesini %68.8±20.1 olarak 2.22 µM BAP + 2.25 µM TDZ içeren MS ortamında, en düşük kallus oluşumunu ise en düşük hormon oranları olan 0.44 µM BAP + 0.45 µM TDZ içeren MS ortamında elde etmişlerdir. Arunyanart ve Chaitrayagun (2005) akuatik bir bitki olan *Nelumbo nucifera* Geartn.’nın genç yaprak eksplantlarıyla yürüttükleri çalışmada en yüksek kallus oluşumunu (%70.0±12.7) 2,4-D 10 µM + BA 1 µM içeren MS ortamında ve en düşük kallus oluşumunu ise

(%10.0±2.8) 2,4-D 10 µM içeren MS ortamında kaydetmişlerdir. Benzer şekilde, Ahmad ve ark (2010) *R. graveolens* bitkisinin yaprak eksplantı ile yaptığı çalışmada en yüksek kallus oluşumunu (%92.3 ± 2.18) 7.5 µM BAP + 1.0 µM NAA içeren MS ortamında elde ettiklerini bildirmişlerdir. Jayaraman ve ark (2014) ise *Aquilaria malaccensis*’in yaprak eksplantı ile yaptıkları çalışmada en uygun kallus oluşumunu 15 g/L süktroz, 1.1 µM NAA + 2.2 µM BAP içeren MS besin ortamında elde etmişlerdir.

Yaprak üst yarısı eksplantında en yüksek kallus oluşum yüzdesi (%100) 0,05 ve 0,25 mg/L GA₃ + 0,25 mg/L TDZ içeren MS ortamlarında, en düşük kallus yüzdesi ise (%50) 1,25 mg/L GA₃ + 0,25 mg/L TDZ içeren MS ortamında tespit edilmiştir (Tablo 3). Yaprak alt yarısı eksplantında ise en fazla kallus oluşturma oranı (%100) 0,05 mg/L GA₃ + 0,25 mg/L TDZ içeren MS ortamlarında elde edilirken, en düşük kallus oluşturma oranı (%61,11) 1,25 mg/L GA₃ + 0,25 mg/L TDZ içeren

MS ortamında elde edilmiştir (Tablo 3). Stanišić ve ark (2015) *Iris sibirica* bitkisinin yaprak tabanı eksplantını 1.0 mg/L 2,4- diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ve 1,0 mg/L TDZ içeren MS ortamında kültüre almış ve kallus oluşum oranlarını sırasıyla %80,9 ve %67 olarak elde etmişlerdir.

Sonuç

TDZ ve GA₃ kombinasyonlarının tam yaprak, yaprak üst yarısı ve yaprak alt yarısı eksplant çeşitlerindeki kallus oluşumu üzerine etkileri araştırılmış ve en yüksek kallus oluşturma oranı GA₃'ün düşük oranda kullanıldığı MS ortamında kaydedilmiştir. Genel olarak kültür ortamlarında GA₃ oranının artışına bağlı olarak eksplantların kallus oluşturma oranları da giderek azalmıştır. Kallus yoğunluğu bakımından yaprak alt yarısı eksplantı, diğer eksplant tiplerine göre daha fazla kallus oluşturma yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. En erken kallus oluşumu en düşük oranda bitki büyüme düzenleyici içeren kültür ortamında yaprak alt yarısı eksplantlarında kaydedilirken, bunu sırasıyla tam yaprak eksplantı ve yaprak üst yarısı eksplantı izlemiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, kallus oluşumu için en iyi eksplantın yaprak alt yarısı olduğu saptanmıştır. Bu çalışma, tıbbi bir bitki olan *R. rotundifolia*'dan bitki doku kültürü teknikleri ile kallus oluşturulması sayesinde bu bitkideki önemli tıbbi bileşiklerin ekstraksiyonu ve bu bileşiklerin de farmasötik alanda kullanımına imkan sağlayabilir.

Teşekkürler

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2130190).

Kaynaklar

Aasim M., Doğan M., Karataş M., Khawar K.M. 2017. *In vitro* direct whole plant regeneration of water lettuce (*Pistia stratiotes* L.) using thidiazuron. Journal of Global Innovation in Agricultural and Social Sciences, 5: 1-4.

Ahmad N., Faisal M., Anis M., Aref I.M. 2010. *In vitro* callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Ruta graveolens* L. South African Journal of Botany, 76: 597-600.

Anonim 2014. *Rotala Rotundifolia*. <http://www.aquaticplantcentral.com/forumapc/plantfinder/details.php?id=39> (*erişim tarihi: 05.01.2018*).

Arunyanart S., Chaitrayagun M. 2005. Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn.). Scientia Horticulturae, 105: 411-420.

Bhowmik S., Saha M., Datta B.K. 2012. Extended distribution of *Rotala rotundifolia* (Buch.-Ham. ex Roxb.) Koehne (Lythraceae) from India. NeBIO, 3: 48-50.

Cheruvathur M.K., Sivu A.R., Pradeep N.S., Thomas T.D. 2012. Shoot organogenesis from leaf callus and ISSR assessment for their identification of clonal fidelity in *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz., a potent anticancerous ethnomedicinal plant. Industrial Crops and Products, 40: 122-128.

Dogan M., Karatas M., Aasim M. 2015. An efficient *in vitro* plantlet regeneration of *Ceratophyllum demersum* L., an important medicinal aquatic plant. Fresenius Environmental Bulletin, 24: 3499-3504.

Dogan M., Karatas M., Aasim M. 2016. *In vitro* shoot regeneration from shoot tip and nodal segment explants of *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze, a multipurpose ornamental aquatic plant. Fresenius Environmental Bulletin, 25: 4777-4782.

Gentile L., Uccella N.A. 2014. Selected bioactives from callus cultures of olives (*Olea europaea* L. Var. Coratina) by LC-MS. Food Research International, 55: 128-136.

Giri L. Dhyani P., Rawat S., Bhatt I.D., Nandi S.K., Rawal R.S., Pande V. 2012. *In vitro* production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *Habenaria edgeworthii*: A rare Himalayan medicinal orchid. Industrial Crops and Products 39: 1-6.

Ho Y.L, Huang S.S., Deng J.S., Lin Y.H., Chang Y.S., Huang, G.J. 2012. *In vitro* antioxidant properties and total phenolic contents of wetland medicinal plants in Taiwan. Botanical Studies, 53: 55-66.

Hoemann C., Krueger K., Hohe A. 2012. Expression analysis of putative genes of pectin modifying enzymes in different callus lines of *Cyclamen persicum* and their correlation with the callus texture. Scientia Horticulturae, 140: 52-59.

Jayaraman S., Daud N.H., Halis R., Mohamed R. 2014. Effects of plant growth regulators, carbon sources and pH values on callus induction in *Aquilaria malaccensis* leaf explants and characteristics of the resultant calli. Journal of Forestry Research, 25: 535-540.

Karatas M., Dogan M., Emsen B. Aasim M. 2015. Determination of *in vitro* free radical scavenging activities of various extracts from *in vitro* propagated *Ceratophyllum demersum* L.. Fresenius Environmental Bulletin 24: 2946-2952.

Karataş M., Aasim M., Çınar A., Dogan M. 2013. Adventitious shoot regeneration from leaf explant of dwarf hygro (*Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anderson). The

- Scientific World Journal, volume 2013, Article ID 680425, 7 pages.
- Kumer Sen M., Nasrin S., Rahman S., Jamal A.H.M. 2014. *In vitro* callus induction and plantlet regeneration of *Achyranthes aspera* L., a high value medicinal plant. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 4: 40-46.
- Li H., Ye Z.H., Wei Z.J., Wong M.H. 2011. Root porosity and radial oxygen loss related to arsenic tolerance and uptake in wetland plants. Environmental Pollution, 159: 30-37.
- Stanišić M., Raspor M., Ninković S., Milošević S., Čalić D., Bohanec B., Trifunović M., Petrić M., Subotić A., Jevremović S. 2015. Clonal fidelity of *Iris sibirica* plants regenerated by somatic embryogenesis and organogenesis in leaf-base culture - RAPD and flow cytometer analyses. South African Journal of Botany, 96: 42-52.
- Tan Q.G, Cai X.H., Feng T., Luo X.D. 2009. Megastigmane-type compounds from *Rotala rotundifolia*. Chinese Journal of Natural Medicines, 7(3): 187-189.
- Tang W., Newton R.J., Charles T.M., 2006. Plant regeneration through multiple adventitious shoot differentiation from callus cultures of slash pine (*Pinus elliottii*). Journal of Plant Physiology, 163: 98-101.
- Te-chato S., Lim M. 2000. Improvement of mangosteen micropropagation through meristematic nodular callus formation from in vitro-derived leaf. Scientia Horticulturae, 86: 291-298.
- Turana S., Cornish K., Kumar S. 2014. Highly efficient callus-mediated genetic transformation of *Parthenium argentatum* Gray, an alternate source of latex and rubber. Industrial Crops and Products, 62: 212-218.